

スプリングスクール 2016

～レーザー顕微鏡で立体画像を撮ってみよう～

1. はじめに

1.1 レーザー顕微鏡とは

レーザー顕微鏡とは、光源にレーザー光を使用した顕微鏡の一種である。高校で主に使用されている顕微鏡は光学式の実体顕微鏡であり、光源には自然光や電球の照明を利用し、試料をそのまま拡大し観察している。一方、今回の実験に使用するレーザー顕微鏡は、同じ光学顕微鏡の中でも光源がレーザー光であり、試料をそのまま見るのではなく、レーザー光でスキャン（走査）してデジタル画像として撮影する。

1.2 観察方式について

立体画像として観察できる範囲は、試料を透過する光の波長に依存します。生体組織では、一般的に可視光の波長でも波長が長い（赤色に近い）ほど、さらに波長の長い近赤外の光の方が、波長が短い（青色や藍色）光よりもよりよく透過します。実験では、488 nm のアルゴンレーザーと 910 nm のチタンサファイア近赤外超短パルスレーザーの 2 種類の光を用いて、どのような立体画像が撮影できるか比較してみましょう。（注意：レーザー光を直接、目で見ると、目に障害を受けるので、決して覗かないこと！！）

- i) **反射式共焦点レーザー走査顕微鏡法**：レーザー光を照射し、試料で反射した光を共焦点方式（二つのピンホールを用いて焦点面以外から発せられる光を除去し、焦点面のみから発せられる光を検出する方法）で検出し、観察する方法。
- ii) **蛍光反射式共焦点レーザー走査顕微鏡法**：レーザー光を試料に照射し、蛍光物質を励起し、反射した蛍光を共焦点方式で検出し、観察する方法。照射光（アルゴンレーザー：488 nm）の波長（励起光といいます）と、検出する蛍光の波長が異なるので、使用する蛍光色素にあわせて検出側の蛍光フィルターを調整します。
- iii) **二光子励起レーザー走査蛍光顕微鏡法**：蛍光を発する試料に波長の長い近赤外レーザー光を強く照射し、二個の光子を同時に吸収（二光子吸収）させることで、蛍光物質を励起して観察する方法。



実験で使用するレーザー顕微鏡 (Leica 社製, TSC SP8MP)

2. 観察試料の作製

2.1 ゼラチンファントムモデルについて

光学顕微鏡で生体組織を観察する際には、生体の細胞内や細胞外、細胞膜において屈折率が異なるので光の散乱が生じる。実験では、生体組織の散乱特性を模擬したゼラチンファントムモデルを作製して、散乱による顕微鏡観察への影響について理解します。散乱物質として、ゼラチン溶液にさまざまな濃度のラテックスビーズを混入し、ファントムモデルを作製します。観察対象には、色の異なる球形の蛍光マイクロビーズをファントムモデルに混入し、レーザー顕微鏡を操作してマイクロビーズの立体画像を撮影します。

2.2 ファントムモデルの作製

2.2.1 使用する薬品と実験器具

☆全員が使用

ゼラチン水溶液（あらかじめ調整済み）、蒸留水、遠沈管(1本)、マイクロピペット(青、黄)、メスシリンダー(10 ml, 1本)、ファントム容器、カバーガラス(1枚)、恒温槽、ボルトテックス

☆各自の作製するファントムモデルによって使用するもの

(1) 散乱を加えないファントムモデル（透明）

赤色の蛍光ビーズ溶液(粒径：1 μm ，材質：ポリスチレン，励起/蛍光波長：580/605 nm)：0.10 ml

(2) 弱い散乱を加えたファントムモデル（うす白色）

ラテックスビーズ溶液(粒径：0.495 μm ，濃度：10%)：0.29 ml，赤色の蛍光ビーズ溶液(粒径：1 μm ，材質：ポリスチレン，励起/蛍光波長：580/605 nm)：0.10 ml

(3) 強い散乱を加えたファントムモデル（白色）

ラテックスビーズ溶液(粒径：0.495 μm ，濃度：10%)：0.59 ml，赤色の蛍光ビーズ溶液(粒径：1 μm ，材質：ポリスチレン，励起/蛍光波長：580/605 nm)：0.10 ml

(4) 2色の蛍光マイクロビーズで作製したファントムモデル（透明）

赤色の蛍光ビーズ溶液(粒径：1 μm ，材質：ポリスチレン，蛍光/励起波長：580/605 nm)：0.10 ml，黄緑色の蛍光ビーズ溶液(粒径：1 μm ，材質：ポリスチレン，励起/蛍光波長：505/515 nm)：0.10 ml

(5) 2種類の大きさの蛍光マイクロビーズで作製したファントムモデル（透明）

粒径が1 μm の赤色の蛍光ビーズ溶液(材質：ポリスチレン，励起/蛍光波長：580/605 nm)：0.1 ml，粒径が10 μm の赤色の蛍光ビーズ溶液(材質：ポリスチレン，励起/蛍光波長：580/605 nm)：1.5 ml

2.2.2 ファントムモデルの作製手順

- ① あらかじめ固めているゼラチン水溶液（濃度 4.7 %）の入った遠沈管を 60°C の恒温槽に入れて溶かす



- ② ラテックスビーズ溶液をマイクロテストチューブに適量移す

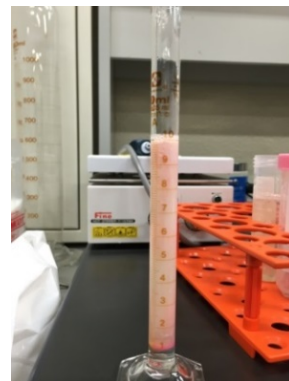
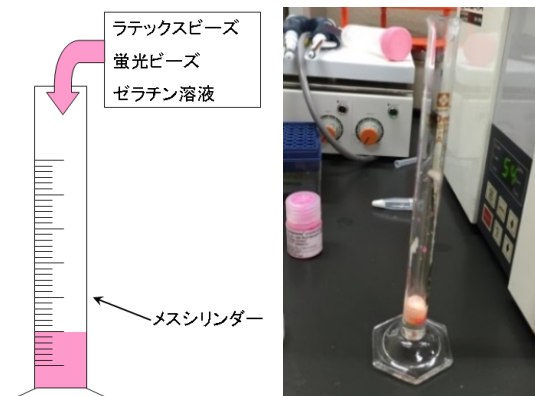


- ③ ラテックスビーズ、蛍光ビーズ溶液をボルテックスで攪拌させる（目盛 4 ~ 6, 15 秒程押し当てる）

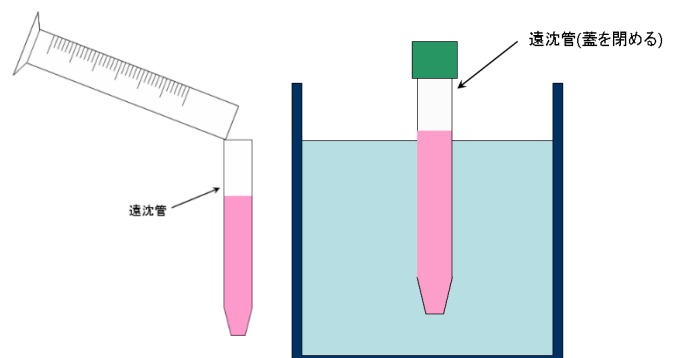


- ④ 溶かしたゼラチン溶液をメスシリンダーに入れた後、マイクロピペットを用いて作製するファントムモデルごとに必要なもの（2.2.1 参照）を入れ、ゼラチン溶液をメスシリンダーの目盛が 10 ml になるところまで加える

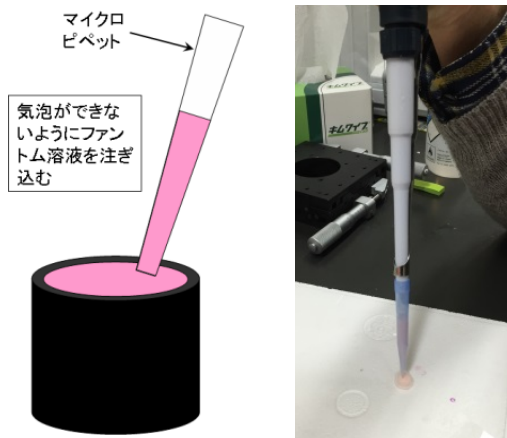
※この時ヤケドしないように注意！



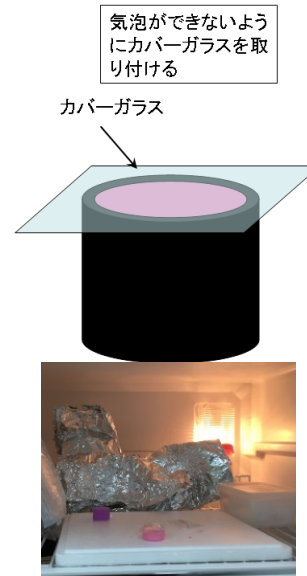
- ⑤ ④を遠沈管に移し、蓋をして 60°C の恒温槽に入れる



- ⑥ ⑤をボルテックスで攪拌させた後、マイクロピペットを用いて容器に注ぐ



- ⑦ 気泡ができないように注意しながらカバーガラスでふたをして冷蔵庫に入れる



- ⑧ 作製したファントムモデルが固まったら完成！

3. ファントムモデルの観察実験

3.1 撮像条件（各自でメモ！）

作ったファントムモデルの番号 _____

撮像範囲 (X, Y, Z) _____

水平面の解像度 _____

深さ方向のステップサイズ _____

取得した画像の見かけの倍率 _____

- ① アルゴンレーザーを照射し、反射光による共焦点顕微鏡画像の撮像
- ② アルゴンレーザーを照射し、反射してくる蛍光による共焦点顕微鏡画像の撮像
- ③ チタンサファイアレーザーを照射し、二光子励起による蛍光画像の撮像

3.2 撮像した画像の保存

コンソール画面の上部にある“Projects”をクリック→自分のファントムモデルのフォルダを右クリック→“Save as…”をクリック→名前をつけて保存する



4. 撮影した立体画像の解析方法

4.1 使用する解析ソフト

各自で取得した蛍光マイクロビーズの顕微鏡画像は、解析ソフト matlab を使用して解析処理し、3次元の立体画像に再構成を行う。

4.2 解析手順

レーザー顕微鏡で取得したデジタル画像を matlab 上で扱えるデータ形式(mat ファイル)に変換する。

データ名、画像情報、二値化閾値などを入力し、画像内の蛍光ビーズを中心とした切り出し画像を作成する。

画面上に表示される切り出し画像を見て、1つの画像内に複数の蛍光ビーズが映っているものがあれば、解析対象より除外する。

選別した蛍光ビーズの切り出し画像のデータをプログラムに入力し、各蛍光ビーズ領域の x , y , z 軸方向における輝度分布のグラフを出力し、そのグラフより求めた蛍光ビーズの伸び情報(点拡がり関数)を取得する。

次に蛍光ビーズの立体画像の再構成を行う。取得した顕微鏡画像は平面方向と深さ方向で解像度が異なるため、深さ方向にデータの補間を行い、解像度を一致させる。

必要に応じて、深さ方向の伸びを補正するためのデコンボリューション処理を行い、立体画像に再構成を行い、各種の撮像モードで撮像した蛍光ビーズの形状を比較する。